

Bilan de la caractérisation moléculaire des souches de *Listeria monocytogenes* isolées de merguez et de charcuterie dans le cadre des plans de contrôle mis en place par la Direction générale de l'Alimentation en 2008 et en 2009

Sophie Roussel (1), Laurence Giuliani (2), Trinh Tam Dao (1), Marie-Léone Vignaud (1), Joël Grout (1), Benjamin Félix (1), Anne Brisabois (1)

(1) Afssa, Laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires, Maisons-Alfort

(2) Ministère de l'alimentation, de l'agriculture et de la pêche, Direction générale de l'Alimentation, Bureau des zoonoses et de la microbiologie alimentaires

Étant donné la recrudescence des cas de listériose humaine observés en France et dans différents États membres de l'Union européenne, la Direction générale de l'Alimentation a mis en place en 2008 et 2009, trois plans de contrôle orientés sur certaines denrées alimentaires potentiellement sensibles en matière de risque lié à *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Ces plans ont pour objectif général d'obtenir des données sur la contamination de certaines catégories d'aliments pour apporter des éléments sur l'exposition au danger pour les consommateurs.

Un plan mis en place en 2008, décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2007-8303, avait pour objectif d'estimer la prévalence et le niveau des contaminations par cette bactérie, dans les merguez crues préemballées contenant de la viande ovine. Ce plan faisait surtout suite à un plan de surveillance réalisé en 2006 de la contamination par *L. monocytogenes* des préparations de viande (DGAL/SDSSA/N2005-8284), qui avait mis en évidence une forte contamination (en termes de prévalence et de concentration) des merguez contenant entre autres de la viande ovine. Dans la plupart des cas, les merguez contiennent un mélange de viandes, bovine, ovine et porcine. Le second plan de 2008, décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2007-8302, prolongé en 2009 par le plan décrit dans la note de service DGAL/SDSSA/N2008-8337, ciblait les saucisses crues à cuire, les lardons, le bacon, les saucisses et saucissons à consommer en l'état, ainsi que les pâtés (type pâtés de foie et terrines) pour le plan 2009.

Pour le plan ciblant les merguez, les échantillons ont été prélevés dans 24 départements, au stade de la fabrication et ont été

analysés en fin de durée de vie (tests de vieillissement). Tous les prélèvements ont été réalisés dans des départements français métropolitains, tirés au sort et comportant des établissements agréés pour la fabrication des produits ciblés.

Pour les plans ciblant les préparations de viandes, les échantillons ont été prélevés au stade de la distribution et analysés en fin de durée de vie (tests de vieillissement). Les prélèvements ont été réalisés dans 65 départements en 2008 et 63 en 2009.

L'objectif du présent travail était de réaliser la caractérisation génotypique des souches de *L. monocytogenes* isolées dans le cadre de ces trois plans de contrôle.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de *L. monocytogenes*

Conformément aux notes de service de la Direction générale de l'Alimentation, les laboratoires réalisant les analyses de détection et de dénombrement de *Listeria monocytogenes* ont fait parvenir leurs isolats au laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa à Maisons-Alfort. Un total de 152 souches (Figure 1, Tableau 1) a été collecté. Certains laboratoires ont fait parvenir plusieurs souches isolées d'un même échantillon. Toutes les souches transmises ont été caractérisées en fonction de leur sérotype moléculaire (par la technique de sérotypage moléculaire) et de leur pulsotype (par la technique d'électrophorèse en champ pulsé après macro-restriction ou PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)).

>> Les méthodes moléculaires de typage des souches

Le sérotypage moléculaire

Le sérotypage a été réalisé selon une méthode moléculaire, en utilisant une méthode de PCR multiplex [1], adaptée de celle de Doumith [2]. Le sérotypage moléculaire permet de différencier cinq sérogroupes, regroupant plusieurs sérotypes. Le sérotype IIa regroupe les sérotypes 1/2a et 3a; le sérotype IIb, les sérotypes 1/2b-3b-7, le sérotype IIc, les sérotypes 1/2c-3c, le sérotype IVa, les sérotypes 4a, 4c, le sérotype IVb, les sérotypes 4ab-4b-4d-4e.

Le typage par PFGE

Le typage par PFGE permet de caractériser précisément les isolats de *L. monocytogenes*.

La technique PFGE consiste à extraire de l'ADN total et à le digérer par deux enzymes de macro-restriction Apal et Ascl, suivant un protocole comparable aux protocoles standardisés proposés par PulseNet (<http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols>) [3,4]. Les profils générés sont systématiquement analysés et comparés aux profils de la base de données du laboratoire puis identifiés par l'attribution, pour chaque profil, d'un numéro de pulsotype, avec le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Belgique, version 5.1). Deux pulsotypes différents au minimum par une bande, comme préconisé par d'autres auteurs [5]. Le numéro du pulsotype avec l'enzyme Apal, suivi du numéro du pulsotype obtenu avec l'enzyme Ascl, correspond à un profil combiné.

Le logiciel permet la construction des dendrogrammes à partir du calcul de la distance entre deux profils selon l'indice de Dice. Le regroupement des profils se fait suivant la méthode UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*). Les deux principaux paramètres conditionnant l'analyse sont la tolérance de position et l'optimisation, et sont fixés à 1 %, comme préconisé par PulseNet Europe [6].

Le laboratoire dispose d'une collection de profils PFGE de souches d'origines variées. Ces profils, reliés aux informations épidémiologiques et phénotypiques, sont archivés dans une base de données gérée par le logiciel BioNumerics. La base de données comprend les profils d'environ 3 700 souches d'origine alimentaire. Cette base de données contient également des profils d'une trentaine de souches humaines provenant d'une étude multicentrique internationale menée par l'Organisation Mondiale de la Santé [7] et de différents laboratoires et obtenues lors de projets de recherche ou d'études. La base contient aussi 12 profils combinés envoyés par le Centre National de Référence des *Listeria* (CNR), associés à des signalements observés entre 2006 et 2009. Un signalement se définit par la mise en évidence sur une période de 14 semaines consécutives d'au moins trois cas de listériose dus à des souches présentant des caractéristiques microbiologiques identiques (profils combinés en PFGE) ou de tout autre phénomène jugé anormal par le CNR.

Tableau 1 : Répartition des 152 souches transmises en fonction du plan de contrôle.

Plan de contrôle	Nombre de prélèvements total par plan	Nombre de prélèvements positifs	Nombre de souches transmises et analysées par sérotypage moléculaire et par PFGE ⁽¹⁾	Nombre de souches en doublons ⁽²⁾
DGAL/SDSSA/N2007-8303	150	75	96	39
DGAL/SDSSA/N2007-8302	600	56	29 ⁽³⁾	0
DGAL/SDSSA/N2008-8337	750	55	27 ⁽³⁾	0
Total	1 500	186	152	39

(1) PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis.

(2) Lorsque deux souches provenant d'un même échantillon présentait un sérotype identique ainsi qu'un seul et même profil combiné PFGE, ces deux souches étaient considérées comme des doublons.

(3) Le nombre d'isolats testés est inférieur au nombre de prélèvements positifs détectés dans le cadre de ce plan de surveillance, signifiant un manque de transmission des souches à l'Afssa, éventuellement lié à un manque d'information des laboratoires sur les souches transmises à l'Afssa (en particulier sur le contexte du prélèvement, avec identification précise du plan de surveillance).

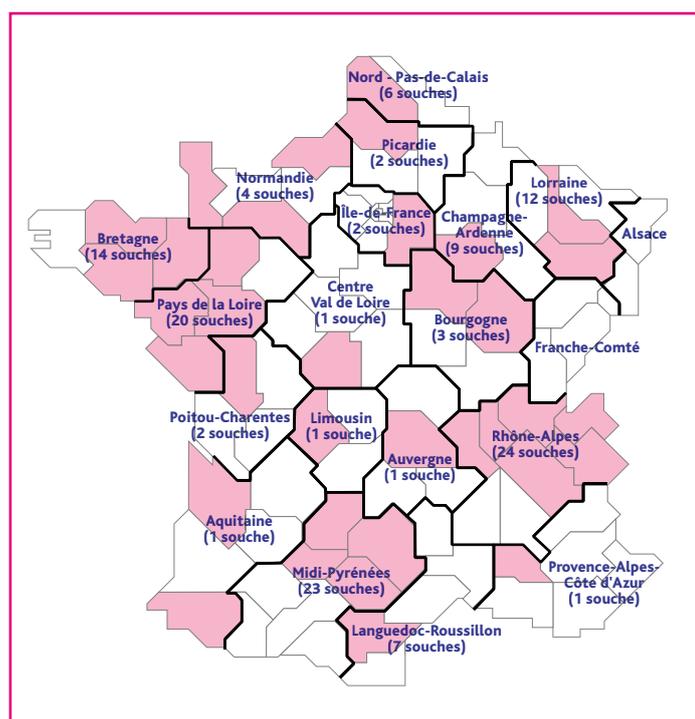


Figure 1 : Départements (indiqués en rose) qui ont transmis des souches à l'unité CEB

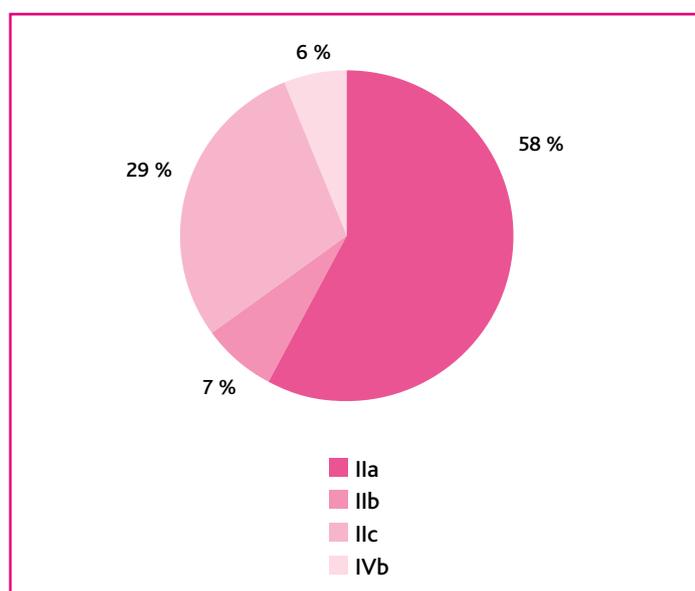


Figure 2 : Répartition des 152 souches de *L. monocytogenes* par sérotype

L'ensemble des analyses a été réalisé sous assurance qualité. Le laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa à Maisons-Alfort est par ailleurs accrédité par le Cofrac selon la norme EN NF ISO/CEI 17025 sous le numéro 1-0245 (www.cofrac.fr).

RÉSULTATS

Sérotypage moléculaire

Les 152 souches se sont réparties en quatre sérotypes (Figure 2). Le sérotype majoritaire était le sérotype IIa (58 %), ce qui est conforme aux résultats observés depuis de nombreuses années. En effet, parmi toutes les souches d'origine alimentaire et environnementale caractérisées depuis 2001 au laboratoire, le sérotype 1/2a est représenté dans 65 % des souches [8].

Il est cependant à noter que le sérotype IIc est bien représenté dans ces plans de contrôle (29 %). Une forte fréquence de ce sérotype avait déjà été observée lors de l'analyse des souches isolées lors du plan de contrôle mis en place par la Direction générale de l'Alimentation en 2006 (DGAL/SDSSA/N2005-8284) [8]. La faible représentation des sérotypes IVb et IIb avait également déjà été observée lors du plan de contrôle 2006 [8].

Résultats de typage par PFGE

Un dédoublonnage a été réalisé de façon à ne considérer dans l'analyse des profils PFGE qu'un seul profil combiné de ce type par échantillon. Sur les 152 souches reçues, 39 souches en doublon ont été éliminées de l'analyse (Tableau 1). Les résultats présentés ci-dessous proviennent de l'analyse PFGE sur 113 souches.

Analyse des profils PFGE

Le Tableau 2 donne la répartition des souches par sérotype et par profil PFGE.

La combinaison des résultats obtenus avec les deux enzymes de restriction permet de différencier les souches en 72 profils combinés (Tableau 2, Figure 3). La grande majorité (57) de ces profils est associée à une seule souche, confirmant ainsi le bon pouvoir discriminant de la méthode. Les autres profils sont communs à au moins deux souches. Pour la majorité, ces profils sont associés à des souches isolées de prélèvements réalisés dans des départements différents. Seulement trois clusters géographiques correspondant à trois profils ont été observés pour des souches isolées dans le même département. Nous pouvons donc conclure que la clusterisation géographique observée est faible.

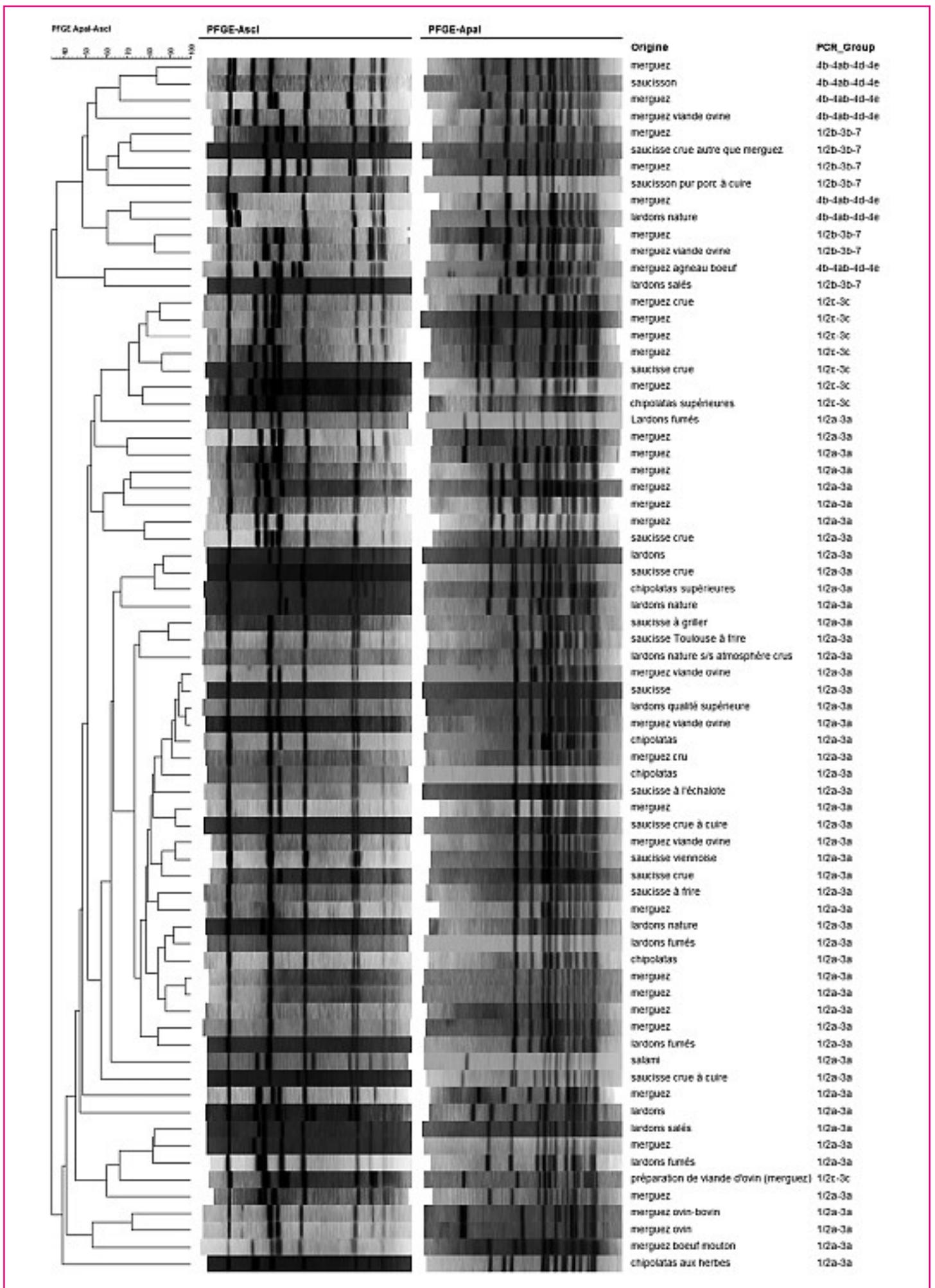


Figure 3 : Les 72 profils PFGE combinés Apal/Ascl identifiés suite à l'analyse PFGE des 113 souches reçues

Les souches des sérogroupes IIa, IIb, IIc et IVb se divisent respectivement en 49, 7, 10 et 6 profils combinés différents (Tableau 2). Tous les profils sont corrélés au séro groupe.

Tableau 2 : Nombre de souches, nombre de profils combinés différents, nombre de profils uniques au sein des quatre sérogroupes

Sérogroupe	Nombre de souches	Nombre total de profils combinés distincts	Nombre de profils uniques (comportant une seule souche)	Nombre de profils communs à des souches isolées d'un même département
IIa	66	49	42	1
IIb	9	7	5	0
IIc	29	10	7	2
IVb	9	6	3	0
Total	113	72	57	3

Comparaison des profils obtenus dans le cadre de cette étude avec les profils de la base de données de l'Afssa

Des 72 profils obtenus, plus de la moitié (55) a déjà été observée fréquemment dans la base de données du laboratoire. Seulement trois profils sont communs aux plans N83002 et N8337 et deux profils communs aux trois plans (Tableau 3). Ces profils communs

sont associés à des souches isolées de produits alimentaires variés (saucisses, merguez, farces, chipolatas, fromage, poisson...) et ne semblent donc pas être associés spécifiquement à une catégorie de produits. Seul un profil (« 146/73 ») observé pour des souches isolées dans le cadre des deux plans de contrôle de 2008, et fréquemment observé dans la base, semble être spécifique de la filière charcuterie. Alors que ce profil avait été observé pour une souche isolée de chipolatas dans le cadre du plan de contrôle en 2006 [8], il n'a cependant pas été observé pour des souches isolées lors du plan de contrôle en 2009.

Tableau 3 : Fréquence des profils obtenus en comparaison avec les profils de la base de données du laboratoire

Sérogroupe	Nombre de profils de l'étude déjà identifiés dans la base de données	Nombre de profils communs aux trois plans de contrôle	Nombre de profils communs aux plans -8302 et -8337 ciblant les mêmes catégories d'aliments	Nombre de profils similaires aux profils de souches humaines
IIa	35	1	2	5
IIb	4	0	0	0
IIc	8	1	1	1
IVb	8	0	0	3
Total	55	2	3	9



Neuf profils sont similaires à des profils de souches humaines disponibles dans la base de données du laboratoire. Parmi ces neuf profils, cinq sont communs à des profils de souches humaines correspondant à des signalements observés entre 2006 et 2009 par le CNR (Tableau 4).

Tableau 4 : Profils communs avec les profils de souches humaines correspondant à des signalements observés par le CNR

Nom du profil combiné commun à un signalement observé par le CNR	Nombre de souches observées dans les trois plans	Origine	Sérogroupe des souches	Plan de contrôle concerné (nombre de souches concernées par plan)
144/85	3	Merguez Saucisses, lardons	IIa	8 303 (1) 8 302 (2)
22/12	2	Merguez	IVb	8 303
94/136	2	Lardons nature Lardons nature	IVb	8 302 (1) 8 337 (1)
6/6	2	Merguez Saucisses	IVb	8 303 (1) 8 302 (1)
70/25	18	Merguez Saucissons, lardons, saucisses...	IIc	8 303 (10) 8 337 (8)

DISCUSSION-CONCLUSION

Les 152 souches de *L. monocytogenes*, isolées à partir de préparations de viande ou de produits à base de viande dans le cadre des plans de contrôle mis en place par la Direction générale de l'Alimentation en 2008 et 2009, se sont réparties en 4 sérogroupe. Le sérogroupe IIa était majoritaire. Ceci est conforme aux résultats observés depuis de nombreuses années. La caractérisation par PFGE a permis de différencier les souches en 72 profils combinés Apal/Ascl. Ces profils sont corrélés au sérogroupe. 79 % des profils n'étaient observés que pour une seule souche, ce qui confirme le bon pouvoir discriminant de la méthode. Plus de la moitié des profils avaient déjà été observés dans la base de données initiale des profils PFGE du laboratoire et correspondent à des souches d'origine alimentaire diversifiée (références). Seul un profil s'est avéré plus particulièrement spécifique de souches isolées de merguez et de chipolatas. Il n'est pas possible d'évaluer la spécificité des profils selon les filières (ovine, bovine, ou porcine) et de calculer la prévalence de *L. monocytogenes* au sein d'une filière donnée étant donné que les aliments ciblés dans ces trois plans contiennent un mélange de viande ovine, bovine et porcine.

Une minorité des profils est similaire à des profils correspondant à des signalements observés par le CNR, ce qui peut être expliqué par la faible diversité génétique des profils des souches humaines correspondant aux signalements par rapport aux souches alimentaires. L'organisation entre les laboratoires d'analyse vétérinaire et agro-alimentaire et le laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires, Afssa, Maisons-Alfort permet d'enrichir chaque année une base de données de portée nationale, avec des informations épidémiologiques et biologiques sur les souches de *L. monocytogenes*. Cet outil sert régulièrement de référence

lors d'investigations ou d'études épidémiologiques. Il constitue un outil précieux pour la recherche des sources de contaminations et pour une meilleure connaissance de l'épidémiologie de cet agent pathogène.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les laboratoires d'analyse vétérinaire et agro-alimentaire pour avoir transmis les souches, au laboratoire d'études et de recherches sur la qualité des aliments et sur les procédés agroalimentaires de l'Afssa.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Kerouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao TT., Brisabois A. (2010) Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80: 134-137.
- [2] Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8): 3819-22.
- [3] Graves LM., Swaminathan B. (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2): 55-62.
- [4] Graves LM., Swaminathan B. (2005) PulseNet's Step-by-Step laboratory protocol for Molecular Subtyping of listeria monocytogenes by macrorestriction and Pulsed-field Electrophoresis. In: *Methods in Biotechnology*. Vol 21 : Food-Borne Pathogens : Methods and Protocols Ed: C.C. Adley, Humana Press Inc, Totowa, NJ: 57-70.
- [5] Peters TM., Maguire C., Threlfall E.J. (2003) The Salm-gene project - a European collaboration for DNA fingerprinting. *Euro Surveillance*, 8:46-50.
- [6] Martin P., Jacquet C., Goulet V., Vaillant V., de Valk H. (2006) Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Listeria monocytogenes* strains : The PulseNet Europe Feasibility Study. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3: 303-308.
- [7] Bille J., Rocourt J. (1996) WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* Subtyping Study- rationale and set-up of the study. *International Journal of Food Microbiology*, 32(3): 251-62.
- [8] Kerouanton A., Marault M., Dao TT., Brisabois, A. (2008). Bilan de la caractérisation des souches isolées dans le cadre du plan de surveillance 2006-contamination par *Listeria monocytogenes* des préparations de viandes. *Bulletin Épidémiologique*, 23-24, 10-11.